



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 278 869 A1

4(51) G 01 N 27/07

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 324 043 4	(22)	27.12.88	(44)	16.05.90
(71)	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, 4010, DD				
(72)	Spohn, Uwe, Dr. Dipl.-Chem.; Miethe, Peter, Dr. Dipl.-Chem.; Voß, Harald, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DD				
(54)	Konduktometrischer Biosensor für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln				

(55) Biosensor, konduktometrischer; Biokatalysator; Lösungsmittel, organisches; Mesophase, lyotrop; Katalysatorschicht; Signaltransduktor; Stützsystem, permeables; Bestimmung; Substanz, gelöst; Substanz, solubilisiert

(57) Gegenstand der Erfindung ist ein konduktometrischer Biosensor für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln. Ihr Ziel ist ein Sensor für die quantitative Bestimmung von in organischen Lösungsmitteln gelösten oder solubilisierten Substanzen mit vergleichsweise geringem apparativen, zeitlichen und Chemikalienaufwand. Erfindungsgemäß besteht der konduktometrische Biosensor aus einem für die zu bestimmende Substanz permeablen Stützsystem und einem Signaltransduktor, zwischen denen eine dünne, aus einer in der Probenlösung nicht löslichen und den Biokatalysator enthaltenden lyotropen Mesophase bestehende Katalysatorschicht gelagert ist. Zur Herstellung der Katalysatorschicht werden in einer aus einem ternären oder pseudoternären System des Typs Tensid/organisches Lösungsmittel/Wasser bestehenden lyotropen Mesophase als Biokatalysator dienende Enzyme, Synzyme, enzymmarkierte Proteine, Mikroorganismen, Zellorganellen, tierische und pflanzliche Zellen solubilisiert. Die zu bestimmende, in der Probenlösung gelösten oder solubilisierten Substanzen diffundieren, über das permeable Stützsystem in die Katalysatorschicht, in der die biokatalysierte Bestimmungsreaktion abläuft und die dabei verursachte Änderung der elektrischen Leitfähigkeit gemessen wird.

Patentanspruch:

1. Konduktometrischer Biosensor für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln zur Bestimmung von gelösten und von solubilisierten Substanzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß zwischen einem für die zu bestimmende Substanz permeablen Stützsystem und einem Signaltransduktor eine dünne Katalysatorschicht aus einer nicht in der Probenlösung löslichen, chemisch und physikalisch gegenüber dem Lösungsmittel stabilen, den Biokatalysator oder ein System von Biokatalysatoren enthaltenden lyotropen Mesophase fixiert ist.
2. Konduktometrischer Biosensor gemäß Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß zur Herstellung der lyotropen Mesophase ternäre oder pseudoternäre Systeme des Typs Tensid/organisches Lösungsmittel/Wasser dienen, wobei als Tensid- und Lösungsmittelkomponente reine Substanzen oder Stoffgemische verwendet und in der Mesophase Biokatalysatoren und Kofaktoren solubilisiert werden.
3. Konduktometrischer Biosensor gemäß Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Tensid nichtionische, anionische, kationische, zwitterionische und kombinierte sowie polymere oberflächenaktive Verbindungen und als organisches Lösungsmittel nicht mit Wasser mischbare Flüssigkeiten, z. B. auf der Grundlage geradkettiger, verzweigter und zyklischer Alkane, von Toluol, Benzen, Xylen, Phthalsäureester, Butylacetat sowie deren fluor- und chlosubstituierte Derivate eingesetzt werden.
4. Konduktometrischer Biosensor gemäß Punkt 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Biokatalysatoren Enzyme, Synzyme, enzymmarkierte Proteine, Mikroorganismen, Zellorganellen, tierische und pflanzliche Zellen in der lyotropen Mesophase solubilisiert werden.
5. Konduktometrischer Biosensor gemäß Punkt 1, 2 und 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein konduktometrisches Meßelektrodensystem als Signaltransduktor eingesetzt wird.
6. Konduktometrischer Biosensor gemäß Punkt 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das permeable Stützsystem aus einer porösen Schicht besteht und z. B. aus einer porösen und/oder einer perforierten lösungsmittelbeständigen Membran aus Polytetrafluorethylen, Polyvinylidendifluorid, fluorierten Ethylen/Propylenmischpolymerisaten oder Papier aufgebaut und am Sensorkörper montiert ist, wobei das Stützsystem gegebenenfalls durch ein Gewebe aus Metalldraht oder Polymerfasern verstärkt wird.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft einen konduktometrischen Biosensor für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln bei der Lebensmittel-, klinischen, biochemischen und Prozeßanalytik zur Bestimmung gelöster und solubilisierter Substanzen.

Charakterisierung der bekannten technischen Lösungen

Bei den in der Literatur beschriebenen konduktometrischen Biosensoren handelt es sich um für die Analyse wäßriger Probenlösungen entwickelte Meßsysteme, die nicht oder nur mit ungenügendem Erfolg in nichtwäßrigen Lösungsmitteln eingesetzt werden können. Die Bestimmung von in organischen Lösungsmitteln gelösten und solubilisierten organischen Substanzen wird bisher durch Flüssigchromatographie, Gaschromatographie, Titrimetrie, Photometrie und Refraktometrie mit relativ großem apparativem, zeitlichem und Chemikalienaufwand durchgeführt. Die genannten Analyseverfahren sind nicht zur In-situ-Überwachung von in nichtwäßrigen Lösungsmitteln ablaufenden chemischen und biochemischen Reaktionen und Prozessen geeignet.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung ist ein konduktometrischer Biosensor für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln und die Bestimmung darin gelöster oder solubilisierter organischer Substanzen mit vergleichsweise geringem apparativem, zeitlichem und Chemikalienaufwand.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist ein konduktometrischer Biosensor für den Einsatz in organischen Lösungsmitteln und die Bestimmung darin gelöster oder solubilisierter Substanzen, wobei die Substanzen Flüssigkeiten, Gase und Feststoffe sein können. Erfindungsgemäß wird zwischen einem für die zu bestimmende Substanz permeablen Stützsystem und einem Signaltransduktor eine dünne Katalysatorschicht aus einer nicht in der Probenlösung löslichen, chemisch und physikalisch gegenüber dem Lösungsmittel stabilen und einen Biokatalysator oder ein System von Biokatalysatoren enthaltenden lyotropen Mesophase fixiert. Die lyotrope Mesophase kann auf der Basis von ternären oder pseudoternären Systemen des Typs Tensid/organisches Lösungsmittel/Wasser hergestellt werden. In der Mesophase werden Biokatalysatoren und Kofaktoren solubilisiert. Als Tensidkomponente werden nichtionische, anionische, kationische, zwitterionische und kombinierte sowie polymere oberflächenaktive Verbindungen eingesetzt.

Geradkettige, verzweigte und zyklische Alkane, Toluol, Benzen, Xylen, Phthalsäureester, Butylacetat sowie deren fluor- und chlosubstituierte Derivate werden als nicht mit Wasser mischbare Lösungsmittelkomponente der lyotropen Mesophase eingesetzt. Als Biokatalysatoren werden Enzyme, Synzyme, enzymmarkierte Proteine, Mikroorganismen, Zellorganellen, tierische und pflanzliche Zellen in der lyotropen Mesophase solubilisiert. Die in der lyotropen Mesophase ablaufenden biokatalytischen Umsetzungen werden über freigesetzte bzw. verbrauchte Ionen konduktometrisch verfolgt und mit der Konzentration korreliert.

Das Stützsystem ist so ausgelegt, daß die Katalysatorschicht am Signaltransduktor fixiert ist, eine konstante und definierte Schichtdicke aufweist sowie von der Probenlösung abgetrennt ist. Das für die zu bestimmende Substanz permeable Stützsystem besteht aus einer porösen Schicht, die z. B. aus einer porösen und/oder einer perforierten lösungsmittelbeständigen Membran aus Polytetrafluorethylen, Polyvinylidendifluorid, fluorierten Ethylen/Propylenmischpolymerisaten oder Papier aufgebaut und am Sensorkörper montiert ist, wobei das Stützsystem gegebenenfalls durch Gewebe aus Metalldraht oder Polymerfasern verstärkt wird.

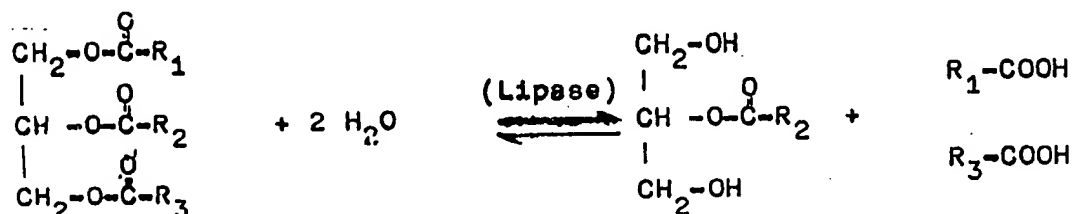
Ausführungsbeispiel

In der zugehörigen Zeichnung zeigen

Fig. 1: die Schnittdarstellung des konduktometrischen Biosensors mit konduktometrischem Signaltransduktor sowie in der lyotropen Mesophase solubilisierter Lipase,

Fig. 2: die mit zwei aufgesputterten Pt-Elektroden versehene Trägermembran aus perfluoriertem Ethylen/Propylenmischpolymerisat.

Die in Fig. 1 gezeigte Ausführungsform des konduktometrischen Biosensors besteht aus dem in den Sensorkörper 1 eingebauten konduktometrischen Signaltransduktor mit den beiden auf die Trägermembran 5 aus perfluoriertem Polypropylen/Polyethylenmischpolymerisat aufgesputterten Pt-Elektroden 6 (Fig. 1) und der als aktive Sensormembran ausgeführten lyotropen Mesophase 2a. Durch Anschluß eines Leitfähigkeitsmeßinstruments an die Sensoranschlußkabel wird die Leitfähigkeit des zwischen den Elektroden 6 liegenden Abschnittes der lyotropen Mesophase gemessen. Die elektrischen Zuleitungen führen durch die Bohrungen 10a und 10b zu den Sensoranschlußkabeln, wobei die Gießdichtungen 11 aus Epoxidharz zur Ausschaltung des Einflusses der Luftfeuchtigkeit dienen. Die Sensoranschlußkabel werden durch die Dichtringkappe 12 und die Abschlußkappe 13 fixiert. Die Dicke der aktiven Sensormembran wird durch die Distanzscheibe 2b aus PTFE auf 0,1–0,2 mm eingestellt. Die einen mittleren Porendurchmesser von 10–40 µm aufweisende PTFE-Membran 3 und die perforierte PTFE-Stützmembran 4 werden zusammen mit der lyotropen Mesophase 2a, analog wie im Beispiel 1 beschrieben, fixiert, wobei die Ringkammer 7 ohne Stauchring ausgeführt ist und die überschüssige Mesophasensubstanz aufnimmt. Die lyotrope Mesophase setzt sich aus 8,55 Ma.-% Polyoxyethylen-7-nonylphenylether, 76,84 Ma.-% n-Hexan, 0,10 Ma.-% Schweine-Pankreas-Lipase und Wasser zusammen. Die durch die Lipase katalysierte hydrolytische Spaltung von Triglyceriden, z. B. nach



führt infolge Dissoziation der entstehenden Fettsäuren $\text{R}_1 - \text{COOH}$ und $\text{R}_3 - \text{COOH}$ zu einer Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit in der lyotropen Mesophase. Die Leitfähigkeitserhöhung korreliert mit der in der Probenlösung enthaltenen Triglyceridmenge, so daß der Sensor zur Bestimmung von Triglyceriden in organischen Lösungsmitteln, wie z. B. n-Hexan, Zyklohexan, n-Oktan, i-Oktan und n-Nonan einsetzbar ist. Der biokatalytische Sensor wird in der beschriebenen Ausführungsform nach jeder Bestimmung durch Eintauchen in destilliertes Wasser regeneriert.

Fig. 1

- 2 -

278869

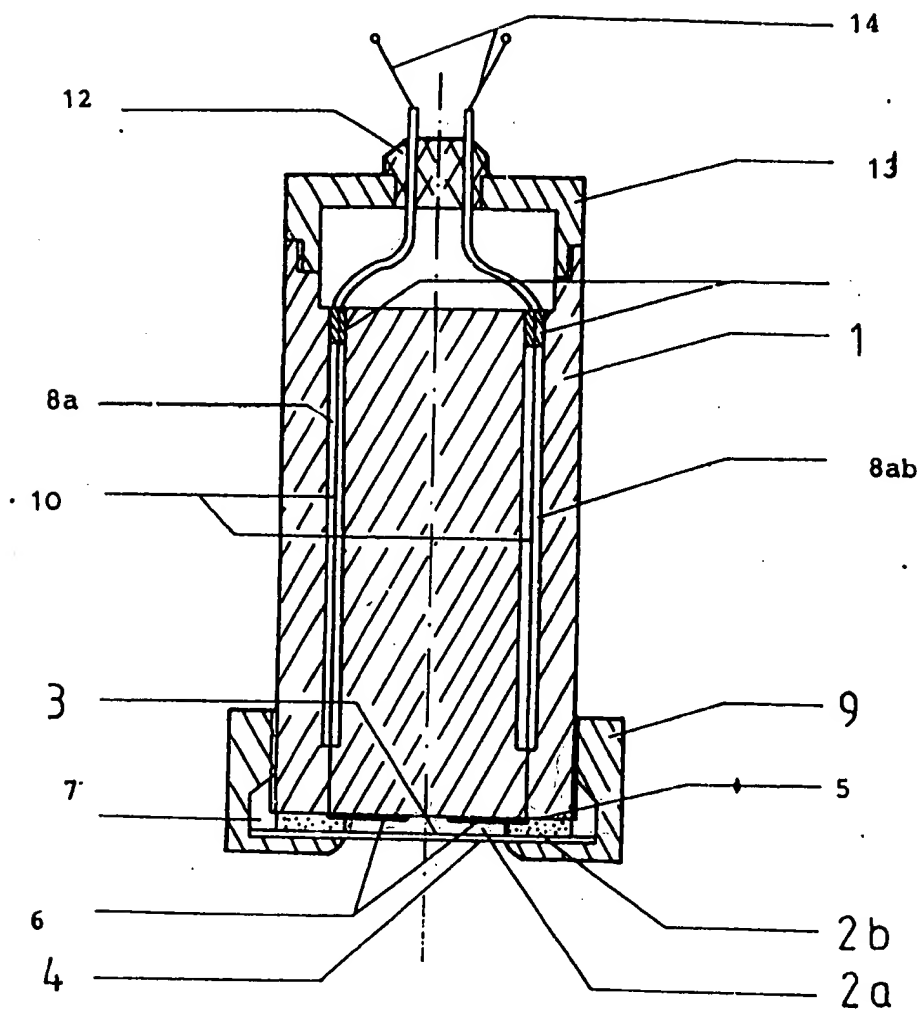


Fig. 2

